

行政院及所屬各機關出國報告

出國類別：研究

乳牛活體採卵技術

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所

出國人職稱：研究員兼副所長

姓名：李善男

出國地區：美國

出國期間：92年8月12日至8月21日

報告日期：92年10月23日

F10/
CO9>04041

摘要：

活體採卵技術由康乃狄克州立大學 Dr. Sanjeeve Chaubal 指導，進行實務示範訓練。採卵器材為超音波探頭、探針及螢光幕。利用直腸觸診技術併同所謂「超音波引導經由陰道取卵」(Ovum Pick Up)，吸取卵巢上之濾泡液。在立體顯微鏡檢查找出未成熟卵子，經體外成熟，體外受精及胚體外培養之過程生產牛胚。但是應用於複製動物所需之受核原，則於卵體外成熟完成後，開始進行細胞核轉置之工作。在研習期間共實施六頭乳牛之 OPU 技術訓練，平均獲得 2.3 個一級卵，此數值為平均標準值。體外生產之牛胚予以冷凍，學習最新之胚冷凍技術，冷凍液配方及冷凍技術有頗多值得學習之處。

康乃迪克州立大學近兩年新成立再生生物學研究中心，網羅尖端科技人員進行群體科技之研究。基礎成員六人，各有專精，均為基因複製科技特殊領域之佼佼者。國內未來基因複製科技之發展，當以此為借鏡。

目次：

摘要.....	1
目的.....	3
過程.....	3
牛體內採卵技術.....	3
體外胚之冷凍方法.....	5
Evergen 生技公司.....	6
康乃迪克大學再生生物學研究中心(University of Connecticut Center for Regenerative Biology) 之研究群及專長....	7
心得.....	8
建議.....	9
附件圖示.....	9

目的：

乳牛人工生殖技術之發展，本所之研究已邁向基因轉殖之階段，在其過程中，體細胞之胚複製技術為不可或缺之一環。鑒於本所已分娩之複製乳牛產後存活率低，受胎率亦低之事實，已有研究報告指出，受核源之卵子品質有重大關係。由活體（健康牛）採卵所取得之受核卵子，可提升複製牛之成功率，為了落實並加強改進本項科技之研發，乃選擇前往美國康乃迪克州立大學研習該項技術，以提升複製動物之成功率。

過程：

牛體內採卵技術

牛卵的體外成熟，體外受精及胚體外培養技術是胚體外生產系統中的三大主軸。對於最優良的牛群而言，胚體外生產是改良後代牛群最快速的科技之一。這種新科技更必須在一種最安全而且可以重複操作的條件下，自牛隻的卵巢採出未成熟的卵子，然後利用胚的體外生產系統生產胚。

另外一種育種方式，稱為多排卵胚移置(MOET)之方法也有相同的目的，也是針對最好的母牛來量產優良胚。但是利用激性腺素超級排卵的方法未必經常有效，在重複使用內泌素的效果以及一些超級排卵的處理上已經有報告指出反應差以及不同程受的變異，有時會誘發出濾泡囊腫問題。此外，有一些經過超級排卵的母牛會生產一些不正常的濾泡以及卵，對於胚之發育較差。這些較不利的因素可能可以利用所謂「超音波引導經由陰道取卵」(OPU)技術來克服。OPU之技術在同一頭母牛可以重複應用，並將其納入體外生產體系之內。除了上述可以獲得優良母牛之胚外，在實用上這些卵子也應用於核轉置及基因操作之用途，作為受核卵之重要來源。

技術要領：

一、不超排：可間隔4天一次OPU。

潤滑液，局部麻醉劑：Lidocaine 2%

Electronic Convex Probe：Aloka Co. LTD

Screen：Aloka Model SSD-500V, 50/60 Hz

Vacuum：70mmHg，長針：Cook Vet. Supplies.

沖洗液：DPBS+1%Heparin. 50ml/頭次

二、器材準備：

1. 用塑膠套（自己裁製）套上探頭，倒入 5-10ml 之沖洗液，用力將外套拉緊，不留任何氣泡及間隙，再將塑膠套固定，保持於緊拉狀態。
2. 套好後，用潤滑液潤滑外套，便於深入陰道內。
3. 準備 55cm 17 號之專用長針。
4. 先行檢測導引真空壓及流速，5-10ml/min。

三、無 FSH 刺激採卵法

1. 每週一次：間隔 7 天採卵一次。
2. 每週二次：間隔 3-4 天採卵一次。
3. 去大濾泡後 48 小時採卵。

四、用 FSH 刺激後採卵法

1. 去大濾泡後 36 小時注射 FSH（6ml 皮下+4ml 肌肉注射），48 小時後採卵。
2. 一週 2 次法：FSH（6ml 皮下+4ml 肌肉注射）；24 小時後採卵，於 96 小時後再採卵。

五、採卵方法：

1. 針刺方向：銀幕顯示均在 2 點鐘方向刺入。
2. 卵巢位置：濾泡掃描到之後，以食、中二指握住卵巢，固定，並將卵巢基質部面向針刺方向。
3. 採卵：探頭在陰道內固定後，於子宮頸邊緣適當之位置，將探針刺出小部分。經由直腸之左手將一側卵巢握住，固定於探針前端。當螢幕顯示濾泡之位置在針刺方向時，即可將針刺出，同時用腳踩真空幫浦，將濾泡液等吸出。
4. 吸出之混和液導入試管中，送到試驗室，在立體顯微鏡下找尋卵子。

六、採卵成果

- 第 1 頭牛：一級卵子數為 2
第 2 頭牛：一級卵子數為 0
第 3 頭牛：一級卵子數為 3
第 4 頭牛：一級卵子數為 5
第 5 頭牛：一級卵子數為 2
第 6 頭牛：一級卵子數為 2
合計六頭：一級卵子數為 14

體外胚之冷凍方法：

培養液

清洗液：m-PBS 及 FBS (10ml)。

冷凍液：m-PBS, ethylene glycol, propandiol, sucrose, FBS。

冷凍前之處理程序

- 一、清洗液分裝四培養皿 (35mm)
- 二、冷凍液分裝二培養皿 (35mm)
- 三、用清洗液洗胚三次
- 四、洗好之胚移入冷凍液
- 五、將胚裝入已用冷凍液洗過之麥管
- 六、電腦控制自動降溫儀預先保持於 0°C，將麥管置入降溫儀 (0°C)
- 七、於 -6.5°C 植冰，並保持 10 分鐘。(必須注意餘熱以修正植冰溫度，必須在 0.5°C 以內)
- 八、降至 -30°C，保持 5 分鐘，然後直接放入液氮中保存。

Evergen 生技公司

一、公司簡介

Evergen 生技公司由楊向中教授(professor Jerry Yang)於 2000 年 8 月成立。楊教授為國際知名的學者以及在農業生技與動物複製科技領域中之佼佼者。公司座落於康乃狄克州，史脫爾市(Storrs, Connecticut)。負責研究、發展、生產以及利用最新的胚生物科技包括核轉置、體外胚生產、體內胚生產、轉基因動物生產、胚性別鑑定以及其他相關生殖科技之產品推廣與服務。

二、研究成果

目前為止，Evergen 的科學研究團隊已經完成了下列的重要科技成果：

1. 從一頭 17 歲的成年公牛體細胞，完成世界第一頭的複製牛，另外也有 6 頭健康的複製小牛誕生。
2. 複製牛胚為例行之工作，發育至囊胚期之比率可達到 35%，而且懷孕率可高達 42%
3. 利用體外胚生產系統(IVP)製作之冷凍—解凍牛胚，移置後可得 70%以上之懷孕率。
4. 從第一代複製動物成功完成第二代的再複製動物。
5. 建立一套利用精子分離後的精液進行體外受精系統，以進行實用的母胚生產技術。

三、公司之發展優勢

1. 已有領先世界的體外胚生產系統與低溫冷凍保存應用技術。
2. 已具有世界上最優良的動物複製技術。
3. 乳肉牛之複製科技已接近於商業化。
4. 與太平洋周邊國家及中國大陸往來密切，具有大的市場潛力，對於高品質乳肉牛生產需要迫切。
5. 轉基因動物生產具有高效率。

康乃迪克大學再生生物學研究中心 (University of Connecticut

Center for Regenerative Biology) 之研究群及專長：

Dr. Joanne C. Conover :

1. 哺乳動物大腦神經發生及神經原之遷徙
2. 胚胎與神經幹細胞特性及分化分析

Dr. Xiang Zhong Yang :

1. 早期胚胎發育及生物技術
2. 醫療性複製之動物模式
3. 體細胞複製之核基因再程序化
4. 胚幹細胞分化

Dr. William L. Fodor :

1. 再生醫學
2. 組織工程
3. 組織修復
4. 免疫調節
5. 藉由遺傳導向之幹細胞分化

Dr. David J. Goldhamer :

1. 哺乳動物發生之細胞命運控制
2. 骨骼肌肉調節基因之轉錄
3. 肌幹細胞功能與柔軟性

Dr. Theodore P. Rasmussen :

1. 幹細胞分化之基礎機制
2. 染色質動力學
3. 上位基因學及 X 染色體不活化
4. 小鼠分子遺傳學

Dr. Cindy Tian :

1. 分化體細胞之核基因再程序化機制
2. 醫療性複製及標的組織再生

心得：

胚之生產可分為兩大體系：其一為體內生產，其二為體外生產。體內生產即一般利用超級排卵取得胚的方式；體外生產則包含了經由屠宰場取得卵巢，或經由活體利用超音波掃描卵巢之取卵技術。胚之生產系統不但為家畜之遺傳改良提供捷徑，也為胚胎工程之發展提供了大量的研究素材。自從『經由直腸超音波掃描影像法』之技術發明用於卵巢及懷孕診斷後，我們便比較容易藉由銀幕正確判定濾泡或囊腫的型態與大小區分。同時，近十年來，由於科技的延伸與發展，利用「超音波引導經由陰道取卵」(OPU)技術已經被大量應用於牛胚之體外生產系統中。

本研習首要之任務即為學習超音波引導經由陰道取卵技術。雖然使用之器材廠牌不同，但是原理相同。不過就操作便利性而言，日式 Aloka 較美式 Pie Medical 為優，假以時日應當可以適應。六頭乳牛之採卵成績共獲得 14 個一級卵子，繼續培養後可以提供作為複製胚所需之受核原的重要來源。此技術之研發，對於未來複製牛之成功產製將有極大助益。

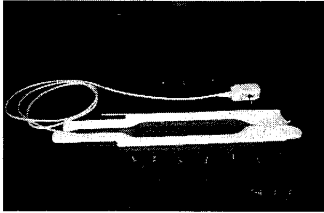
在美期間並參訪 Evergen 生技公司，此公司由楊向中教授(professor Jerry Yang)於 2000 年 8 月成立。主要進行研究、發展、生產相關生殖科技之產品推廣與服務。研究中心位於賓夕凡尼亞州，Wyalisine 鎮。此鎮接近美東之最大屠宰場，日宰近千頭牛。因此在合約下易於取得所需之大量卵巢，供研究與生產之用。Evergen 生技公司並引進 XY 公司之性鑑別冷凍精液，作體外授精生產母胚供外銷市場需要。牛精子的公母鑑定與篩選已經開始商業化了。公母精子篩選所費不貲，但效率改進成本降低，將有利於畜牧業的發展。

康乃迪克州立大學近兩年新成立再生生物學研究中心，網羅尖端科技人員進行群體科技之研究。國內未來基因複製科技之發展，在資源有限之條件下，集合產官學組成研發團隊，亦以此為借鏡。

建議：

科技之發展日新月異，而研發之成果亦獲得不易。欲跟隨時代之進步，必須引進新科技，其方法不外進行國際交流，否則無法克竟其功，培訓人才應為當務之急。

附件圖示



超音波引導經由陰道取卵器材



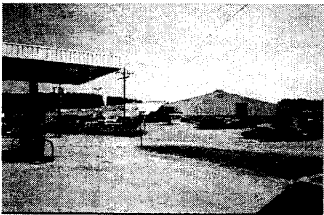
技術操作



經由螢幕觀察取卵情形



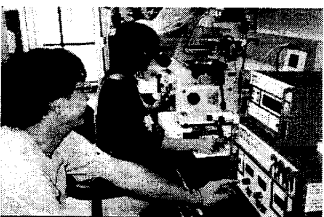
抽取出之含卵培養液



賓州 Wyalisine 鎮之最大屠宰場



Evergen 之體外胚生產系統



康州大學之核轉置研究



XY 公司合作計畫之性別分離牛精液



康州大學之複製牛群



利用性別分離牛精液作體外授精